



TITLE:

Studies Based on Statistical Mechanics for Mechanism of Multidrug Efflux of AcrA/AcrB/TolC (Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Mishima, Hirokazu

CITATION:

Mishima, Hirokazu. Studies Based on Statistical Mechanics for Mechanism of Multidrug Efflux of AcrA/AcrB/TolC. 京都大学, 2015, 博士(エネルギー科学)

ISSUE DATE:

2015-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19092>

RIGHT:

許諾条件により本文は2016/02/01に公開; Adapted with permission from The Journal of Physical Chemistry B, 116, 7776-7786 (2012), ACS Publications. Copyright 2015 American Chemical Society.
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp301541z>; This is the author's version of a work that was accepted for publication in Chemical Physics Letters. The work was published by Elsevier in Chemical Physics Letters, 561-62, 159-165 (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2013.01.045>; This is the author's version of a work that was accepted for publication in The Journal of Chemical Physics. The work was published by the American Institute of Physics in The Journal of Chemical Physics, 139, 205102(1-13) (2013), <http://dx.doi.org/10.1063/1.4832896>; Adapted with permission from The Journal of Physical Chemistry B, 119, 3423-3433 (2015), ACS Publications. Copyright 2015 American Chemical Society.
<http://pubs.acs.org> ...

(続紙 1)

京都大学	博士 (エネルギー科学)	氏名	三嶋 浩和
論文題目	Studies Based on Statistical Mechanics for Mechanism of Multidrug Efflux of AcrA/AcrB/TolC (AcrA/AcrB/TolC の多剤排出機構に関する統計力学的研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>本論文は、「溶媒に対して分子モデルを採用する；必要に応じて蛋白質及びそれらの複合体を原子レベルで扱う；申請者が所属する研究室で開発された独自の統計力学理論を適用する；溶媒分子の並進移動に起因したエントロピー効果を機軸とする」などの特徴を有しており、全5章から成る。</p> <p>第1章は序論で、AcrA/AcrB/TolC や ABC トランスポーターなどに対する研究の現状と課題について議論している。これらの蛋白質複合体は、細胞内に侵入した薬剤を自らの内部に挿入した後、細胞外に排出する。この機能には多様な薬剤を排出できる多剤性という特徴があり、例えば、緑膿菌にはいかなる抗生物質も効かないということと関連する。ホモトリマーである AcrB の実験による立体構造解析の結果から、その薬剤排出に対して機能的回転と呼ばれる描像が提唱されている。これは、各プロトマーの周期的な構造変化(待機→結合→排出→待機→…)をトリマー全体で(待機・結合・排出)→(結合・排出・待機)→(排出・待機・結合)→(待機・結合・排出)→…という方式で行うものであるが、その仕組みは謎に包まれている。議論の中で、「挿入と放出という正反対の過程がなぜ同じシステム内で引き続いて起こるのか；多剤性のメカニズムは何か；機能的回転の仕組みは何か」の3点が未解明の最重要課題であることを指摘している。</p> <p>第2章では、溶媒(水、リン脂質の炭化水素基の集まり)によって容器(TolC, ABC トランスポーター)－溶質(薬剤)間に平均力のポテンシャル PMF (両者が無限に離れた場合を基準にした、両者がある位置関係に存在するときの系の自由エネルギー)が形成されることを示すと共に、PMF をエントロピー項とエネルギー項に分けて議論し、以下のことを明らかにしている：弱い疎水性または弱い親水性の容器内表面を選ぶと、溶質にとって容器内とバルクはエネルギー項の観点からはほぼ同じ環境になり、溶媒分子の主として並進移動に起因するエントロピー項が支配的になる；エントロピー項は溶質が疎水性か親水性かに鈍感である；エントロピー項のみで挿入と放出を起こすことが可能である。一旦挿入された溶質に対し、容器の幾何学的形状を連続的に変化させ、エントロピー項の空間分布を変化させることによって挿入から放出への切り替えができることを示している。</p> <p>第3章では、種々の大きさの溶質を挿入後、同じ容器形状の変化のさせ方によって溶質の放出が実現できることを示している。容器形状の変化のさせ方は複数通りあるが、例えば、「入り口側に直径を水分子直径の2倍だけ小さくした部位を作り、その長さを徐々に長くして行く」ことにより、溶質を搾り出すことができる。容器形状の変化は、ABC トランスポーター</p>			

では ATP のそれへの結合, TolC ではプロトンの高濃度側から低濃度側への移動に伴う AcrB の構造変化が AcrA を通して TolC に伝えられることによって生じるものと考えられる。PMF のエントロピー項は溶質が疎水性か親水性かに鈍感であり, しかも種々の大きさの溶質を挿入・放出することが示されたので, 「多剤性」を見事に説明できたことになる。

第 4 章では, AcrB の機能的回転に対する統計熱力学を構築している。3 通りの異なる立体構造をとるプロトマーが構成するホモトリマー AcrB の立体構造を溶媒和エントロピーの観点から解析し, 以下のことを明らかにしている: 各プロトマー間の立体構造の違いはそれほど大きくはないが, 充填効率に若干の不均一性が見られ, 各プロトマーの溶媒和エントロピーがこの不均一性に大きく依存して変化する; プロトマー単独で薬剤排出の (待機→結合→排出→待機→...) なる構造変化を行うことは途中で $300k_B T$ (k_B はボルツマン定数, T は絶対温度) もの自由エネルギー上昇が要求されるため事実上不可能である; しかし, トリマーでは, あるプロトマーの構造変化が溶媒のエントロピー損失を伴うとき, 他の 2 つのプロトマーがそれを打ち消すように構造変化をすることにより, 溶媒のエントロピーをほぼ一定に保つことができる; その結果, 1 サイクルでたった 1 個のプロトンを高濃度側から低濃度側に移行させることにより (僅か $8k_B T$ の自由エネルギー低下で), 薬剤排出のための構造変化が可能となる。

蛋白質の折り畳みが系の自由エネルギーの低下を伴う不可逆過程であることは, 始状態と終状態で蛋白質の立体構造が異なることから容易に理解できる。一旦折り畳みが終了すると立体構造はゆらぐだけで変化しない。ところが, AcrB の立体構造は 1 サイクルの始状態と終状態で全く同じである。それでも一方向に回転しているように見える構造変化が起こるのは, その過程がプロトンの高濃度側から低濃度側への移行という自由エネルギー低下を伴う不可逆過程とカップルしているからである。第 4 章では, プロトン駆動力に対する以上のような興味深い考え方が示されている。さらに, F_1 -ATPase の一方向回転のメカニズムとの類似性も論じられており, ATP 加水分解サイクルの役割に対する新しい考え方が示されている。

第 5 章は本論文の総括である。分子動力学シミュレーションでは, その長大な計算時間のため, 薬剤排出サイクルのある 1 つの素過程しか対象にできないが, 本論文では高効率の統計力学理論を用いることにより, サイクル全体を見渡すことが可能になっている。その結果, トランスポーターによる溶質の挿入と放出 (溶質を繰り返し一方向に移動させること), 多剤性のメカニズム, AcrB の機能的回転の仕組みを初めて明らかにすることができている。溶質の溶媒和特性がバルク溶媒中とナノメートルスケール容器の空間内の溶媒中で大きく異なることの重要性を浮き彫りにした点も注目に値する。プロトン駆動力や ATP 加水分解を利用して作動する一連の蛋白質複合体に適用できるエネルギー論の構築にも大きく貢献する。さらに, AcrB の機能的回転のメカニズムの解明は, 生物の高効率なエネルギー利用システムの理解を深めるものである。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、「溶媒に対して分子モデルを採用する；必要に応じて蛋白質複合体を原子レベルで扱う；申請者が所属する研究室で開発された高効率の統計力学理論を用いる；溶媒分子の並進移動に起因したエントロピー効果を機軸とする」などの特徴を有しており、AcrA/AcrB/TolC や ABC トランスポーターなどの多剤排出に関する解析を行ったものである。得られた主な成果は次の通りである。

(1) 溶媒によって容器 (TolC, ABC トランスポーター) - 溶質 (薬剤) 間に平均力のポテンシャル PMF が形成されることを示した。PMF はエントロピー項とエネルギー項に分けて考えることができるが、弱い疎水性または弱い親水性の容器内表面を選ぶと、溶質にとって容器内とバルクはエネルギー項の観点からはほぼ同じ環境になり、溶質が疎水性か親水性かに鈍感であるエントロピー項が支配的になることを示した。

(2) 「エントロピー項で溶質を一旦挿入した後、容器の幾何学的形状を連続的に変化させ、エントロピー項の空間分布を変化させることによって挿入から放出への切り替えができること」および「種々の大きさの溶質を挿入後、同じ容器形状の変化のさせ方によって放出できること」を示し、多剤排出のメカニズムを初めて明らかにした。

(3) 3 通り異なる立体構造をとるプロトマーが構成するホモトリマー AcrB の充填効率を溶媒とエントロピーの観点から解析し、以下のことを明らかにした。プロトマー単独で薬剤排出に必要な一連の構造変化を行うことは、非常に大きな自由エネルギー上昇が要求されるため不可能である。トリマーでは、あるプロトマーの構造変化が充填効率の低下および溶媒のエントロピー損失を伴うとき、他の 2 つのプロトマーがそれを打ち消すように構造変化をすることにより、溶媒のエントロピーをほぼ一定に保つことができる。その結果、1 サイクルでたった 1 個のプロトンを高濃度側から低濃度側に移行させることにより (ごく小さな自由エネルギー低下で)、薬剤排出が可能となる。

(4) プロトン駆動力や ATP 加水分解を利用して作動する一連の蛋白質複合体の機能発現を横断的に捉え、プロトンの高濃度側から低濃度側への移動や ATP の加水分解の役割に対する 1 つの新しい考え方を提示した。

以上のように、トランスポーターによる溶質の挿入と放出 (溶質を繰り返し一方向に移動させること)、多剤性のメカニズム、AcrB の機能的回転の仕組みを初めて明らかにした。プロトン駆動力や ATP 加水分解を利用して作動する一連の蛋白質複合体に適用できるエネルギー論の構築にも大きく貢献した。AcrB の機能的回転のメカニズムの解明は、生物の高効率なエネルギー利用システムの理解を深めるものである。

よって、本論文は博士 (エネルギー科学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 27 年 2 月 20 日に実施した論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。

論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文の全文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降